IZS PB 06/21 RC

Valutazione dei livelli di IPA e Nitrosammine in prodotti carnei sottoposti a differenti trattamenti di cottura

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Dr.ssa VALERIA NARDELLI

Relatore Convegno Ricerca e Territorio 2025 IZSPB: Dr. Marco Iammarino

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono comuni inquinanti sia di origine naturale che antropica. Possono essere presenti negli alimenti anche a seguito della cottura alla brace o del processo di affumicatura, e su frutta e verdura per deposizione atmosferica in aree inquinate. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato come probabili (classe 2A) o possibili (classe 2B) cancerogeni per l'uomo, alcuni IPA [1]. Pertanto, la Commissione Europea ha fissato dei tenori massimi per il benzo(a)pyrene (BaP) e per la somma di quattro IPA: benzo(a)antracene (BaA), chrysene (Chr), benzo(b)fluoranthene (BbF) e benzo(a)pyrene (BaP), in alcuni prodotti alimentari.

Le N-Nitrosammine sono composti che possono essere presenti nelle carni a seguito della reazione tra ammine secondarie ed ossido nitrico. Si tratta di sono sostanze "pro-cancerogene", ovvero che necessitano di una attivazione per poter esercitare attività cancerogena. Diversi organi possono essere bersaglio di tale attività, tra questi, quello maggiormente riportato in letteratura è il colon-retto. La recente opinione scientifica pubblicata dall'EFSA [2] ha individuato complessivamente 32 N-Nitrosammine come possibili contaminanti degli alimenti, tra queste, 10 sono state individuate come potenzialmente pericolose per l'uomo, e precisamente: N-Nitrososarcosina (NSAR), N-Nitrosodimetilammina (NDMA), N-Nitrosomorfolina (NMOR), N-Nitrosometiletilammina (NMEA), N-Nitrosopirrolidina (NPYR), N-Nitrosodietilammina (NDEA), N-Nitrosopiperidina (NPIP); N-Nitrosodipropilammina (NDPA); N-Nitrosometilanilina (NMPha), e N-Nitrosodibutilammina (NDBA) [3].

L'obiettivo del presente progetto è stato la valutazione della presenza di alcuni contaminanti di processo, quali IPA e Nitrosammine, in campioni a base di carne sottoposti a vari trattamenti di cottura.

La prima fase del progetto ha previsto lo sviluppo dei due metodi analitici per la determinazione delle due classi di contaminanti.

Il metodo utilizzato per la ricerca degli IPA è basato su un'estrazione in fase solida dispersiva (QuEChERS) ottimizzata con una doppia estrazione in acetonitrile, l'utilizzo di sali di estrazione QuEChERS dSPE EMR-Lipid, Bond Elut e di sali di purificazione dSPE Tube (0,4g NaCl / 1,60g $MgSO_4$) specifici, con una fase intermedia di congelamento. Tale metodo è stato precedentemente sviluppato per un'altra tipologia di matrice [4], e ulteriormente ottimizzato per l'analisi di prodotti carnei con la modifica della fase di congelamento a -80 ˚C per 10 minuti. La quantificazione è stata eseguita tramite GC-MS/MS. Tutti i parametri MS/MS sono mostrati nella Tabella 1. In accordo con la Decisione 2021/808/CE, sono stati scelti uno ione precursore e due ioni prodotto per ciascun IPA, in modo da garantire un numero di punti di identificazione adeguato. Infatti, per queste sostanze, sono richiesti almeno tre punti di identificazione, ed ogni ione figlio deve assicurare 1.5 punti di identificazione (Tabella 1 e Figura 1).

Analiti	Q_1 First Mass (m/z)	Q_3 First Mass (m/z)	Collision Energy (V)
Benzo(a)antracene	228	227 – 226 - 202	25 - 40 - 35
Crisene	228	227 – 226 - 202	25 - 40 - 35
Benzo(b)fluorantene	252	248 – 226 - 224	60 - 35 - 60
Benzo(a)pirene	252	250 – 248 - 224	45 - 60 - 60

PCB 209	497.7 - 495.8	427.7 - 425.7	30 - 30
Benz(a)antracene D12	240	238 - 236	30 - 40
Crisene D12	240	238 - 236	20 - 38
Benzo(b)fluorantene D12	265.1 - 264.1	261.1 - 260.1	40 - 40
Benzo(a)pirene D12	265.1 - 264.1	261.1 - 260.1	40 - 40

Tabella 1 - Condizioni MS/MS del GC 7000 Agilent

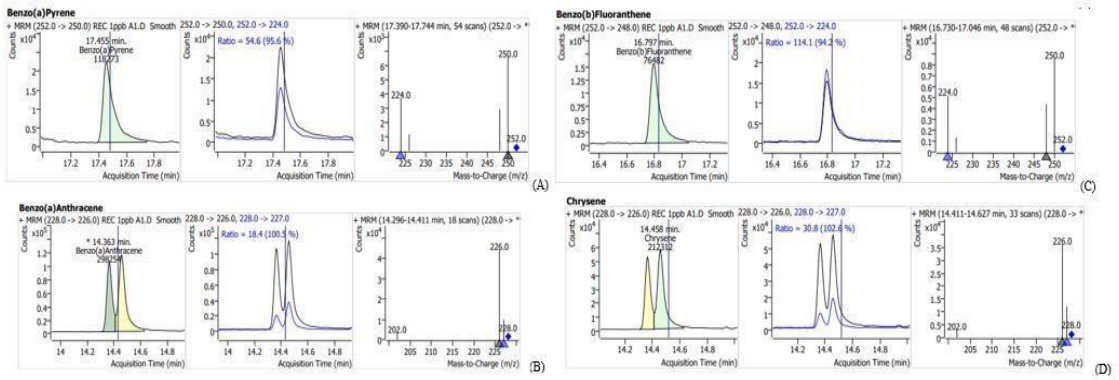


Figura 1 – Cromatogrammi degli MRM dei quattro IPA al livello di 1 µg/kg (a sinistra) e relativi spettri di massa (a destra): Benzo(a)pirene (A); Benzo(a)Antracene (B); Benzo(b)Fluorantene (C) e Crisene (D)

Una volta definita la procedura analitica, si è proceduto con la validazione della metodica. I parametri esaminati ai fini della validazione sono stati i seguenti: linearità, precisione e recupero, robustezza, LOD e LOQ, incertezza di misura. In tabella 2 sono riportati tutti i parametri di validazione ottenuti a seguito di questa fase del progetto.

	Linearità		**Precisione (2 µg/kg)**		**Recupero (2 µg/kg)**		**LOD (µg/kg)**	**LOQ (µg/kg)**	**Incertezza (2 µg/kg su due repliche)**	**Robustezza**
	Rapporto $t_{sb}/b < 0.22$	**(R^2)**	**σ_r**	**RSDr%**	**Recupero (%)**	**$\sigma_r R$**				
BaP	0.11	0.99	0.16	8.51	93.55	7.96	0.22	0.67	23.77	Applicabile a tutti i prodotti a base di carne
BaA	0.06	0.99	0.18	10.03	90.00	9.02	0.14	0.44	27.82	
BbF	0.07	0.99	0.09	4.46	93.81	4.31	0.13	0.40	13.20	
Cry	0.09	0.99	0.07	3.86	93.84	3.61	0.08	0.25	11.70	

Tabella 2 – Principali parametri di validazione del metodo sviluppato

Il metodo validato, ottimizzato per la determinazione quali-quantitativa di Benzo(a)pirene e somma di Benzo(a)pirene, Benzo(a)antracene, Benzo(b)fluorantene e Crisene in campioni di carni, applicabile anche ai prodotti ittici, è stato accreditato dalla struttura nell'anno 2024. Pertanto, questa metodica è impiegata per le attività di controllo ufficiale presso la S.C. Chimica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata.

Per quanto concerne le N-Nitrosammine, è stato sviluppato un metodo analitico basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione per determinare le dieci nitrosammine di interesse elencate in precedenza. L'analisi è stata condotta in modalità SIM, consentendo una rilevazione sensibile e selettiva. È stato utilizzato un approccio multivariato basato sul disegno sperimentale (DoE) per ottimizzare i parametri di estrazione liquido-liquido delle nitrosammine da campioni di carne, come l'acidificazione e la miscela dei solventi. In particolare, si è impiegato un disegno composito centrale (CCD) per la costruzione di modelli polinomiali di secondo ordine, in combinazione con una metodologia di ottimizzazione della desiderabilità (DOM). Il metodo ha consentito così l'accurata determinazione delle 10 N-Nitrosammine, con un LOQ pari a 0.5 ppb.

In una prima fase sperimentale sono state condotte prove per valutare la variazione dei livelli di nitrati e nitriti in prodotti carnei sottoposti a diversi trattamenti di cottura, essendo tali additivi strettamente connessi con la formazione di nitrosammine. Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante cromatografia ionica con

rivelazione conduttimetrica, mediante metodi validati ed accreditati dalla struttura. In totale, 60 campioni di prodotti carnei (wurstel pollo e tacchino, wurstel suino, pancetta e salsiccia) sono stati analizzati tal quali e dopo 3 trattamenti di cottura alternativi: piastra per 5', bollitura per 15', forno (15' 180 °C). I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.

Tipo campione	N° campioni analizzati	N° marche diverse analizzate	Conservante indicato in etichetta (N° campioni)	N° campioni [NO_2^-] < LOQ	[$NaNO_2$] (mg/kg) [range] (valore medio) (Campione crudo)	[$NaNO_3$] (mg/kg) [range] (valore medio) (Campione crudo)	Variazione media % [$NaNO_2$] dopo forno	Variazione media % [$NaNO_2$] dopo piastra	Variazione media % [$NaNO_2$] dopo bollitura	Variazione media % [$NaNO_3$] dopo forno	Variazione media % [$NaNO_3$] dopo piastra	Variazione media % [$NaNO_3$] dopo bollitura
Wurstel pollo/tacchino	15	10	E250	1	[1.0 – 65.7] (25.9)	[20.2 – 89.1] (34.4)	-24.1	-14.7	-43.5	+60.2	+53.3	+8.9
Wurstel suino	15	10	E250	2	[0.9 – 74.4] (9.8)	[15.7 – 56.5] (30.7)	-20.0	-47.9	-37.6	+36.5	+47.8	-4.9
Pancetta	15	10	E250 + E252 (10) E250 (5)	6	[1.2 – 12.9] (3.6)	[13.7 – 150.8] (81.3)	-26.1	+10.4	+6.3	+77.4	+63.6	-53.0
Salsiccia fresca sottovuoto	15	3	E250	6	[1.8 – 48.6] (10.1)	[5.3 – 135.9] (76.5)	-8.8	+3.4	-25.8	+43.9	+94.4	+30.2

Tabella 3 – Determinazioni di nitriti e nitrati in 4 tipologie di prodotti carnei processati, prima e dopo 3 differenti trattamenti di cottura

Il primo risultato importante ottenuto è che i trattamenti di cottura sortiscono sostanzialmente un effetto opposto riguardo i nitriti ed i nitrati. Infatti, la cottura, in generale, fa diminuire i livelli residui di nitriti nel prodotto ed aumentare quelli di nitrati. Per quanto riguarda i nitriti, la bollitura comporta una diminuzione significativa della concentrazione finale, al momento del consumo, variabile tra -25.8% (salsiccia stagionata) e -43.5% (wurstel di pollo), mentre non si riscontrano variazioni significative sui campioni di pancetta. Riguardo i nitrati, la cottura su piastra comporta sempre un aumento significativo della concentrazione finale, variabile tra +47.8% (wurstel suino) e +94.4% (salsiccia stagionata). Questo risultato è importante in quanto fornisce un ulteriore elemento a sfavore della cottura su piastra dei prodotti carnei. Altro risultato molto significativo è che, tenuto conto del limite massimo stabilito nel Reg. N. 1333/2008/CE per i nitrati (150 mg/kg come $NaNO_3$), e dell'incertezza di misura del metodo (9.7%), tutti i campioni al momento del prelievo non hanno fatto registrare concentrazioni di $NaNO_3$ superiori a tale limite. Dopo cottura, invece, sono stati registrati numerosi campioni con concentrazioni superiori al limite. In particolare, la cottura su piastra ha causato il numero più elevato di campioni "positivi". Anche la cottura in forno, in alcuni casi, ha causato un aumento di concentrazione fino a valori al di sopra del limite [5].

Nella seconda fase del progetto sono state svolte le prove di cottura su quattro diverse tipologie di carne: lonza, capocollo, hamburger di pollo e di scottona, prelevati presso macellerie locali; tali campioni sono stati cotti impiegando vari metodi di cottura (Tabella 4)

N.	METODO DI COTTURA	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	CRUDO	-	-
2	Frittura con olio di girasole	170	7
3	Frittura con olio extravergine di oliva	170	7
4	Forno	230	20
5	Grill	200	15
6	Grill elettrico	200	25
7	Friggitrice ad aria	200	10
8	Grill - cottura prolungata	200	25
9	Friggitrice ad aria con olio extravergine di oliva	200	10
10	Frittura con olio extravergine di oliva usato	170	15
11	Frittura con olio di girasole usato	170	15

Tabella 4 – Metodi di cottura utilizzati con relativi tempi e temperature

Per quanto riguarda le determinazioni degli IPA, i campioni cotti sono stati analizzati mediante il metodo analitico validato, descritto in precedenza. Alcune prove di fortificazione a livelli molto bassi di concentrazione dei 4 IPA sono state effettuate al

fine di determinare un unico limite di quantificazione per i 4 analiti. Al termine di tali prove è stato definito un limite di quantificazione pari a 0.01 µg/kg per i 4 analiti in esame. Nei campioni crudi non è stata rilevata la presenza di IPA, invece, a seguito di cottura, vi è uno sviluppo di queste sostanze, come riassunto in Tabella 5.

Cottura N.	LONZA					CAPOCOLLO					HAMBURGER SCOTTONA					HAMBURGER POLLO				
	BaA	BaP	BbF	Cri	SOMMA	BaA	BaP	BbF	Cri	SOMMA	B(a)A	B(a)P	B(b)F	Cri	SOMMA	B(a)A	B(a)P	B(b)F	Cri	SOMMA
1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**<LOQ**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**<LOQ**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**<LOQ**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**<LOQ**
2	0.23	<LOQ	0.196	0.068	**0.494**	0.08	0.16	0.124	0.02	**0.385**	0.171	0.1	<LOQ	<LOQ	**0.271**	0.182	<LOQ	<LOQ	0.039	**0.22**
3	0.231	<LOQ	<LOQ	0.079	**0.31**	0.08	0.155	0.11	0.064	**0.408**	0.175	0.199	<LOQ	0.027	**0.4**	0.177	0.2	<LOQ	0.028	**0.404**
4	0.222	<LOQ	0.193	0.059	**0.474**	0.065	<LOQ	0.098	<LOQ	**0.163**	0.168	0.1	<LOQ	<LOQ	**0.268**	0.089	0.1	<LOQ	0.029	**0.217**
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.05	**0.05**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**0**	0.171	0.101	<LOQ	<LOQ	**0.272**	<LOQ	0.101	<LOQ	<LOQ	**0.101**
6	0.22	<LOQ	<LOQ	0.055	**0.275**	0.064	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**0.064**	<LOQ	0.101	<LOQ	<LOQ	**0.101**	<LOQ	0.101	<LOQ	0.022	**0.123**
7	0.219	<LOQ	<LOQ	0.056	**0.275**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**0**	0.086	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**0.086**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**<LOQ**
8	0.228	<LOQ	<LOQ	0.066	**0.294**	0.071	0.154	0.15	0.012	**0.387**	0.173	0.099	<LOQ	0.0185	**0.291**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.044	**0.044**
9	0.224	<LOQ	<LOQ	0.069	**0.293**	0.068	<LOQ	<LOQ	0.012	**0.079**	0.085	<LOQ	<LOQ	<LOQ	**0.086**	<LOQ	0.2	<LOQ	<LOQ	**0.2**
10	0.273	<LOQ	0.179	0.098	**0.55**	0.092	0.15	0.146	0.055	**0.442**	<LOQ	0.0995	<LOQ	0.0375	**0.137**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.092	**0.092**
11	0.253	<LOQ	0.228	0.094	**0.575**	0.095	0.179	0.174	0.043	**0.491**	0.085	0.099	<LOQ	0.013	**0.197**	<LOQ	0.1	<LOQ	<LOQ	**0.1**

Tabella 5 – Determinazione dei quattro IPA e relativa somma a seguito di varie tipologie di cottura

È stato possibile valutare che i vari trattamenti termici possono portare ad uno sviluppo di IPA, ma i livelli medi sono ben al di sotto dei limiti di legge stabiliti a livello Europeo. Tali livelli dipendono dal tipo di prodotto ma, in maggior misura, dal tipo di cottura effettuato. In particolare, i livelli più elevati si ottengono a seguito di cottura effettuata mediante impiego di olio e quando i tempi sono particolarmente prolungati. Entrambi i risultati trovano conferma in letteratura, in quanto è nota la relazione tra quantità di grasso e sviluppo di IPA ad elevate temperature, così come la diretta proporzionalità tra tempi di cottura ed incremento di tali contaminanti.

Il medesimo piano sperimentale è stato attuato per le determinazioni delle 10 N-Nitrosammine. Tali analiti non sono stati quantificati a seguito di vari trattamenti di cottura delle 4 tipologie di carni fresche testate (C < LOQ = 0.5 ppb), confermando che questi contaminanti di processo non rappresentano una problematica significativa per la sicurezza alimentare delle carni non trattate con nitriti e nitrati.

Bibliografia

[1] IAMMARINO M., MARINO R., NARDELLI V., INGEGNO M., ALBENZIO M. (2024). Red Meat Heating Processes, Toxic Compounds Production and Nutritional Parameters Changes: What about Risk–Benefit? Foods, 13(3), 445.

[2] EFSA CONTAM PANEL (EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN). (2023). Scientific Opinion on the risk assessment of N-nitrosamines in food. EFSA Journal, 21(3), 7884, 278 pp.

[3] IAMMARINO M., NARDELLI V. (2023). Nitrosammine ed alimenti: Un rischio sottovalutato? XII Workshop dei laboratori nazionali di riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo. Rapporti ISTISAN 24/13, 94-102.

[4] INGEGNO M., ZIANNI R., DELLA ROVERE I., CHIAPPINELLI A., NARDELLI V., CASAMASSIMA F., CALITRI A., QUINTO M., NARDIELLO D., IAMMARINO M. (2024). Development of a Highly Sensitive Method based on QuEChERS and GC-MS/MS for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Infant Foods. Frontiers in Nutrition, 11:1403541.

[5] IAMMARINO M., BERARDI G., TOMASEVIC I., NARDELLI V. (2023). Effect of Different Cooking Treatments on the Residual Level of Nitrite and Nitrate in Processed Meat Products and Margin of Safety (MoS) Assessment. Foods, 12, 869.